

TARTU ÜLIKOOL

Loodus-ja tehnoloogiateaduskond

Keemia Instituut

MEELI ARUJÕE

ANTIBIOOTKUMIDE BIOSENSORRIVIS KASUTAVATE ENSÜÜMIDE

PUHASTAMINE JA ERALDAMINE

Magistritöö kolloid- ja keskkonnakeemia erialal

Juhendajad: vanemteadur Toonika Rinken, PhD

teadur Kairi Kivirand, PhD

TARTU 2013

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	3
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	4
1.1 Antibiootikumide biosensorrivi tööpõhimõte ja selles kasutatavate ensüümide iseloomustamine.....	4
1.1.1 β -galaktosidaasi iseloomustamine ja eraldamine.....	5
1.1.2 Galaktoosi oksüdaasi iseloomustamine ja eraldamine.....	6
1.1.3 Laktaadi oksüdaasi iseloomustamine ja eraldamine.....	8
1.2 Valkude puhastamise üldised strateegiad	9
1.3 Jogurtikultuuri YC-X11 iseloomustamine.....	11
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	13
2.1 Kasutatud reaktiivid.....	13
2.2 Jogurtikultuuri YC-X11 kasvatamine ja baktermassi ettevalmistamine ensüümide puhastamiseks.....	13
2.3 Ensüümide aktiivsuse iseloomustamine	14
2.4 Ioonvahetuskromatograafia läbiviimine	15
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	16
3.1 Ensüümide aktiivsuste määramine	16
3.2 Antibiootikumide biosensoris kasutatavate ensüümide YC-X11 jogurtikultuurist eraldamise strateegia optimeerimine	18
3.3 Jogurtikultuuri YC-X11 homogeniseerimine	19
3.4 Ensüümide eraldamine ioonvahetuskromatograafia abil.....	20
3.4.1 β -galaktosidaasi eraldamine.....	20
3.4.2 Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi eraldamine.....	23
3.5 Järeldused ja eksperimendi edasine planeerimine	25
KOKKUVÕTE.....	26
SUMMARY	27
KASUTATUD KIRJANDUS	28

SISSEJUHATUS

Antibiootikumijääkide sisaldus toidus ja ümbritsevas keskkonnas on muutumas järjest tõsisemaks probleemiks. Ravimite laialdane ning põhjendamatu kasutamine soodustab haigusttekitavate bakterite ravim-resistentsuse kujunemist, mis on tänapäeva meditsiini ja inimeste tervisekaitse üks tõsisemaid probleeme ning millele seniajani ei ole suudetud head lahendust leida. Ravim-resistentsete bakterite kujunemise peamiseks teguriks on antibiootikumide korduv ja ebaõige tarvitamine. Lisaks võivad antibiootikum-resistentsed bakterid levida ka loomadelt inimestele, nimelt loomse toiduga või ka kokkupuutel loomade väljaheidetega [1]. Resistentsus antibiootikumidele on muutumas tõsiseks ohuks, 2013. aasta märtsikuus võrdles Briti valitsuse kõrgeim tervishoiuametnik Sally Davies seda ülemaailmse terrorismiohuga [2].

Antibiootikumide määramine on kulukas ja aeganõudev protsess. Enamlevinud antibiootikumide (nagu näiteks β -laktaamid, sulfonamiidid, tetratsükliinid) määramiseks piimas kasutatakse tänapäeval kromatograafilisi, mikrobioloogilisi või immunoloogilisi meetodeid. Ehkki nende meetodite määramispiirid on väga madalad, on puuduseks suur ajakulu ja kõrge hind. Standartsete meetodite kõrval on kirjanduses välja pakutud ka biosensorite, mis enamasti põhinevad antibiootikumijääkide mõju detekteerimisel erinevate ensüümide poolt katalüüsitud reaktsioonide kiirusele, kasutamine.

Käesoleva töö eesmärgiks oli eraldada antibiootikumide biosensorris kasutatavad ensüümid, mis katalüüsivad piimas looduslikult leiduvate substraatidega toimuvaid reaktsioone: laktoosi hüdrolyüsi katalüüsiv β -galaktosidaas, laktoosi oksüdeerumist katalüüsiv galaktoosi oksüdaas ning laktaatide oksüdeerimist katalüüsiv laktaadi oksüdaas. Oksüdaaside eraldamiseks kasutati algmaterjalina jogurtijuuretist YC-X11, millel on varasemate uuringute põhjal olemas katalüütiline aktiivsus piimas leiduva laktoosi ja laktaatide suhtes. Juuretises leiduvaid mikroorganisme paljundati vedelsöötmes, leiti efektiivseim meetod rakkude purustamiseks ning optimeeriti valkude sadestamist ning ioonvahetuskromatograafia läbiviimise tingimusi eelnimetatud ensüümide eraldamiseks. Ensüümide aktiivsused erinevates puhastusetappides määrati hapnikuanduri abil.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

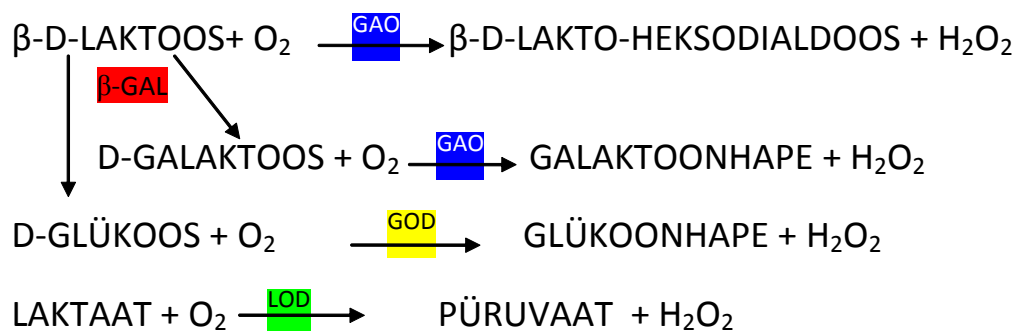
1.1 Antibiootikumide biosensorrivi tööpõhimõte ja selles kasutatavate ensüümide iseloomustamine

Antibiootikumid on mikroobi- ehk bakterivastase toimega ravimite rühm, mida kasutatakse bakterite poolt põhjustatud infektsioonide raviks [1]. Organismi sattudes võivad antibiootikumid tekitada mitmesuguseid allergilisi reaktsioone ning põhjustada resistentsust samasse klassi kuuluvate antibiootikumide suhtes [3]. Peale inimestel tekkivate otseste terviseprobleemide on toitu sattunud antibiootikumid probleemsed ka toidu töötlemisel (näiteks piima töötlemisel juustuks või jogurtiks), kuna inhibeerivad starterkultuuride aktiivsust ning koagulatsiooniprotsesse [4].

Antibiootikumide jääkide määramiseks piimas kasutatakse erinevaid kromatograafilisi, mikrobioloogilisi või immunoloogilisi meetodeid [5]. Enim kasutatavate meetodite puudusteks on kõrge hind, pikk ajakulu ja keeruline proovi eeltöötlus. Kiire, odav ning kompaktne võimalus antibiootikumi jääkide määramiseks on biosensorid, mille bioselektiivse osana kasutatakse ensüüme või antikehi [5, 6]. Biosensortehnoloogia põhineb spetsiifilise bioäratundmisreaktsiooni ja selle mõõdetavaks signaaliks muutmise integreerimisel [7].

Kariloomade ravimiseks kasutatakse erinevaid antibiootikume, mis on jagatud struktuuri alusel neljateistkümnesse suuremasse klassi (näiteks β -laktaamid, sulfonamiidid, tetratsükliinid jt.) - seega on nende määramiseks vaja kasutada erinevatel bioselektiivsetel elementidel põhinevaid sensoreid [8]. Peamised piimas leiduvad substraadid, mida saab kasutada looduslike referentssubstraatidena on laktaadid ja laktoos [9].

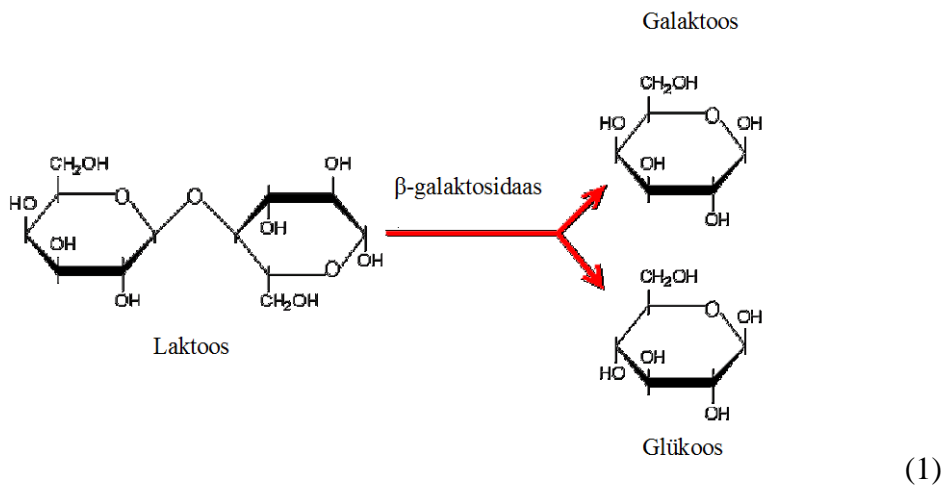
Nende substraatide määramiseks saab kasutada erinevaid oksüdaase: galaktoosi oksüdaasi (GAO), glükoosi oksüdaasi (GOD) ja laktaadi oksüdaasi (LOD), aga ka hüdrolaaside klassi kuuluvat β -galaktosidaasi (β -GAL) [9]. Vastavate ensüümide poolt katalüüsitavad reaktsioonid, mis toimuvad biosensorravis ning mille toimumine on detekteeritav hapniku kontsentratsiooni muutumise järgi, on toodud joonisel 1.



Joonis 1. Biosensorravis toimuvad reaktsioonid piima substraatide laktoosi ja laktaadi suhtes ensüümide β -galaktosidaasi, galaktoosi oksüdaasi, glükoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi, toimel.

1.1.1 β -galaktosidaasi iseloomustamine ja eraldamine

β -galaktosidaas (EC 3.2.1.23, β -GAL) kuulub hüdrolaaside põhiklassi, mis katalüüsib laktoosi hüdrolyüsi kaheks monosahhariidiks, glükoosiks ja galaktoosiks [10]:



β -GAL süstemaatiline nimetus on β -D-galaktosiid galaktohüdrolaas [11]. β -GAL-i optimaalsed pH ja temperatuuri vahemikud on varieeruvad ja sõltuvad sellest, millisest allikast on ensüüm eraldatud. pH optimumid jäävad vahemikku 1,5-9, kuigi enamusel β -GAL-del on see vahemikus 6-7 [11]. Temperatuuri optimumi vahemik on samuti väga lai, koguni 0-90 °C [11].

β -GAL on selektiivne laktoosi suhtes [12]. Lisaks laktoosile on β -GAL substraatideks näiteks 2-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiid, p-nitrofenüül- β -D-ksülopüranosiid jt [11]. β -GALi

inhibiitoriteks on glükoos ja galaktoos, mis on ka laktoosi hüdrolüüsi reaktsiooniproduktideks [13]. Lisaks inhibeerivad ensüümi veel 2-amino-galaktoos, 2-merkaptotetanool, AgNO_3 ning ka mitmed metallioonid nagu näiteks Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} ja Mg^{2+} [11].

β -GAL-i molekulmass jääb laia vahemikku 19-750 kDa, ning sõltub algmaterjalist, millest ensüüm on eraldatud [11]. Näiteks bakterist *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* eraldatud β -GALi molekulmassiks on saadud 220 kDa [14]. β -GAL-i on eraldatud ka *Aspergilluste*, *Bacilluste*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* ja *Streptococcus thermophilus* perekondade mikroorganismidest [11,15,16]. Lisaks mikroorganismidele on β -galaktosidaasi eraldatud ka seentest, pärmidest, taimedest ja looma rakkudest [17].

β -GAL on intratsellulaarne ensüüm [18]. Bakterirakkude lõhustamiseks on kasutatud mitmeid erinevaid meetodeid, näiteks külmutamist-sulatamist, ultrahelilaineid, homogeniseerimist uhmris, lüüs puhvrit ja lüütilisi ensüüme [18,19].

β -GALi eraldamiseks kasutatakse ammoniumsulfaadiga sadestamist ning mitmeetapilisi kombineeritud kromatograafilisi meetodeid, mille saagised on toodud tabelis 1.

Tabel 1. β -GALi saagis kasutades erinevaid puhastamise metoodikaid

Kultuur	Eraldamise metoodika	Saagis	Viide
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	sadestamine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ga (50% küllastuskonts.), ioonvahetuskromatograafia, afiinsuskromatograafia, elektroforees	8%	[20]
<i>Lactobacillus</i>	sadestamine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ga (80% küllastuskonts.), ioonvahetuskromatograafia	0,3%	[21]

β -GALi kasutatakse laktoosi määramise biosensorites koos glükoosi (GOD) ja/või galaktoosi oksüdaasiga (GAO). Nendel ensüümidel põhinevad biosensorid mõõdavad hapniku tarbimist kaskaadse ensüümreaktsiooni viimases etapis [17]. Laktoosi biosensoreid kasutatakse toiduainetetööstuses, meditsiinis, veterinaarias ja keskkonna uuringutes [17].

1.1.2 Galaktoosi oksüdaasi iseloomustamine ja eraldamine

Galaktoosi oksüdaas (E.C. 1.1.3.9, GAO) on vaske sisaldav metalloensüüm [22]. GAO süstemaatiline nimetus on: hapnik 6-oksüdoreduktaas [11]. GAO kalatüüsi galaktoosi

oksüdeerumist aldehüüdiks, millega kaasneb hapniku redutseerumine vesinikperoksiidiks (joonis 1) [22,23]. Substraadi oksüdatsiooni reaktsioon toimub mitmes etapis, mis järgib nn. ping-pong mehhanismi, mille käigus tekivad lühikese elueaga vaheühendid ja radikaalid [22]. GAO pH optimum jääb vahemikku 5,5-8 ja temperatuuri optimum on 30-50 °C [11].

GAO ei sisalda tüüpilisi redokskofaktoreid (milleks on näiteks flaviinid, nikotiinamiinid, kinoonid); selle asemel on GAO-l aktiivtsenter, milles on kahe vaba radikaaliga Cu²⁺ kompleks [24,25]. Ensüümi substraatideks on β-D-laktoos, primaarsed alkoholid, glükolipiidid, 2-deoksü-D-galaktoos, rafinoos, guaraan jm [11,26,27]. GAO inhibeerijaks on EDTA, mis takistab sidemete tekkimist [28]. Veel vähendab ensüümi aktiivsust AgNO₃, L-askorbiinhape hüdroksüülamiin jt [11,27].

Ensüümi molekulmass jääb vahemikku 24-90 kDa [11]. GAO-d on eraldatud *Fusarium graminearum*, *Fusarium acuminatum*, *Dactylium dendroide*, *Giberella fujikuroi* ja *Hypomyces rosellus* seentest [11, 23, 26, 27]. Erinevates organismides võib GAO esineda nii intra- kui ka ekstratsellulaarselt [23,26]. Rakuväliste ensüümide eraldamiseks pole algmaterjali homogeniseerimist vaja; küll aga on kasutatud ensüümi sisaldava segu surumist läbi steriilse sõela, et eraldada ensüüm segavatest lisanditest, milleks on näiteks rakukestad, teised rakud, organellid ja lipiidid [23].

GAO puhastamiseks on kasutatud ammoniumsulfaadiga sadestamist ning mitmeetapilisi kombineeritud kromatograafilisi meetodeid, mille saagised on toodud tabelis 2.

Tabel 2. GAO saagis kasutades erinevaid puhastamise meetoodikaid

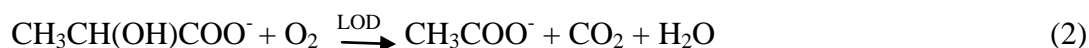
Kultuur	Eraldamise meetoodika	Saagis	Viide
<i>Fusarium acuminatum</i>	Sadestamine (NH ₄) ₂ SO ₄ -ga (90% küllastuskonts.), Afiinsuskromatograafia	42%	[27]
<i>Dactylium dendroides</i>	Ioonvahetus-, afiinsuskromatograafia	74%	[29]

Nagu eespool mainitud, kasutatakse GAO-d sageli koos β-GAL-iga biosensori selektiivse osana laktoosi määramiseks. GAO-d on kasutatud ka ilma teiste ensüümideta biosensoris selektiivse osana, mis suudab määrata nii laktoosi kui ka galaktoosi sisaldust lahuses [30].

1.1.3 Laktaadi oksüdaasi iseloomustamine ja eraldamine

Laktaadi oksüdaas (LOD, EC 1.13.12.4) kuulub oksüdo reduktaaside klassi ja oksüdaaside alamklassi, mis katalüüsivad molekulaarse hapniku osalusel toimuvaid redoksreaktsioone [31]. LOD süstemaatiline nimi on: (S)-laktaat: hapnik-2-oksüdo reduktaas [11]. LOD katalüüsib L-laktaadi oksüdeerumist hapniku toimet, mille käigus tekib püruvaat ja vesinikperoksiid (joonis 1)[32].

Reaktsiooni saadusena võib tekkiv vesinikperoksiid LOD aktiivsust inhibeerida ning suhteliselt kõrge H₂O₂ kontsentratsioon põhjustab L-laktaadi lagunemise atsetaadiks, süsinikdioksiidiks ja veeks [33,34]:



Optimaalne pH vahemik LOD-i sõltub mõnevõrra algmaterjalist, millest ensüüm on eraldatud ning jääb 6,0-7,7 vahele [11,35]. Laktaadi oksüdaasi aktiivsus sõltub temperatuurist ning saavutab maksimumi 35°C juures [36].

Kofaktorina sisaldab LOD stabiliseerivat riboflaviin-5-fosfaati, mis kuulub flaviinmononukleotiidide (FMN) perekonda ning osaleb substraadi sidumises ja katalüüsi protsessides [32].

LOD omab kõrget selektiivsust L-laktaatide suhtes, mistõttu kasutatakse vastavat ensüümi sageli laktaadi biosensorites. Peale selle on LOD selektiivne ka L-malaadi, 2-hüdroksübutüraadi, glükolaadi, L-p-metüülmandelaadi jt substraatide suhtes [11,37]. Erinevalt L-laktaadist on D-laktaat, mida võib leida verest bakterite liigse kasvu tulemusena, LOD inhibiitoriks [38]. Peale selle vähendavad LOD aktiivsust veel näiteks L-mandelaat, atsetaat, L-hüdroksübutüraat, fosfaat ning kloriid [11,39].

LOD molekulmass jääb vahemikku 187- 370 kDa, sõltuvalt sellest, millisest bakteritüvest on ensüüm eraldatud [11]. LOD on eraldatud *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ja *Pediococcus* ning *Mycobacterium* perekondadesse kuuluvatest mikroorganismidest [11, 33,40,41]. LOD sisaldavate rakukultuuride homogeniseerimiseks on kasutatud erinevaid meetodeid, näiteks ultrahelilainetega lõhustamist või mehaanilist purustamist Al₂O₃ juuresolekul [42-43].

Sarnaselt β-GAL-ile ja GAO-le on LOD puhastamisel kasutatatud ammooniumsulfaadiga sadestamist ning erinevaid kromatograafilisi meetodeid (tabel 3).

Tabel 3. LOD saagis kasutades erinevaid puhastamise metoodikaid

Kultuur	Eraldamise metoodika	Saagis	Viide
Gram negatiivne bakterikultuur <i>KY6</i>	Sadestamine (NH ₄) ₂ SO ₄ -ga (70% küllastuskonts.), ioonvahetus-, geel-, afiinsuskromatograafia	7%	[35]
<i>Aerococcus viridans</i>	Afiinsus-, ionvahetuskromatograafia	24%	[44]

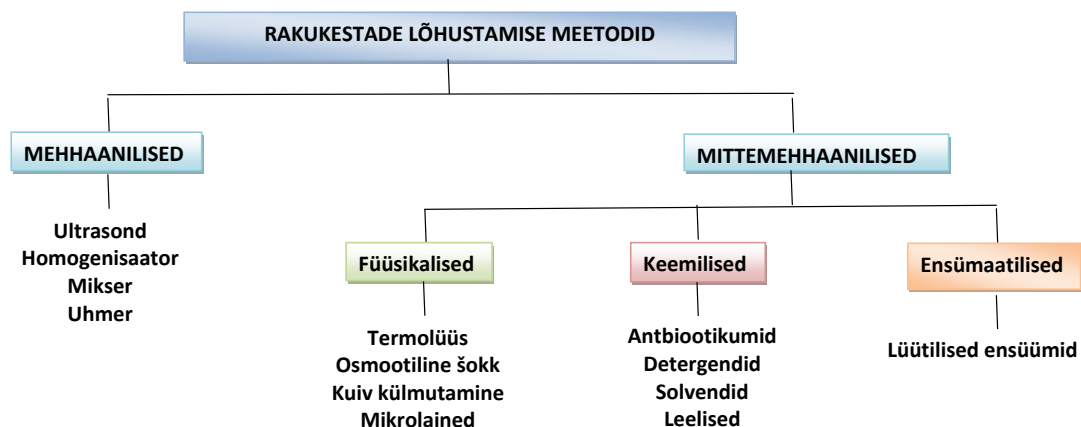
Laktaadi oksüdaasil põhinevaid biosensoreid kasutatakse lisaks piimas leiduva laktaadi määramiseks laialdaselt ka meditsiinilises analüüsis laktaadi määramiseks veres, aga ka teistes bioloogilistes vedelikes [45]. Samuti on sellised laktaadi biosensorid kasutusel veini tootmisel ja toiduainete tööstuses [40, 46].

1.2 Valkude puhastamise üldised strateegiad

Valkude puhastamine kujutab endast rida erinevaid protsesse, mille käigus eraldatakse soovitud biomolekulid elusaid rakke sisaldavast algmaterjalist, milleks on tavaliselt mingi bioloogiline kude või mikrobioloogiline kultuur [47]. Enamasti koosneb valkude puhastamine mitmest etapist. Vahel on vajalik ka mõningate etappide kordamine, et saavutada puhastatava valgupreparaadi suurem puhtus.

Valkude puhastamiseks ja eraldamiseks kasutatakse erinevaid kromatograafilisi meetodeid. Enne kromatograafia kasutamist on vajalik algmaterjali ette valmistamine. Selleks tuleb eraldatav valk esmalt viia lahusesse, milleks kasutatakse näiteks homogeniseerimist, tsentrifuugimist ja sadestamist [48].

Rakusisese valgu viimiseks lahusesse tuleb esmalt lõhkuda rakukestad. Rakumembraani lõhustamise meetodeid on palju, üldiselt jagatakse need kahte suuremasse rühma: mehhaanilised ja mittemehhaanilised. Viimased jagunevad omakorda füüsikalisteks, keemilisteks ja ensümaatilisteks. Joonisel 2 on toodud üldine skeem enamkasutatavatest meetoditest [49].



Joonis 2. Rakukestade lõhustamise meetodid

Proovi ettevalmistuse järgmine etapp on valguliste ja mitte-valguliste ühendite üksteisest eraldamine. Selleks kasutatakse kõige sagedamini väljasoolamist ehk sadestamist [47]. Enim kasutatud sool on ammooniumsulfaat.

Kolmas etapp valgu puhastamisel on soolade eraldamine proovist. Enamasti kasutatakse selleks dialüüsi, mille käigus eraldatakse väiksemad soolamolekulid suurtest valgumolekulidest poolläbilaskva dialüüsikile abil [47]. Teine võimalus soolade eraldamiseks on kasutada geelfiltratsiooni spetsiaalseid väljasoolamise kolonne (*desalting column*) [50], mille põhimõte on sama, mis dialüüsil.

Kõikide eelpoolkirjeldatud etappide lõpus viiakse läbi proovi tsentrifuugimine, mille käigus väheneb segavate ühendite, nagu näiteks rakukestade, rakumembraanide, lipiidide jms hulk [49].

Viimaste puhastamise etappidena kasutatakse enamasti erinevaid vedelik-kromatograafia meetodeid, mida rakendatakse vastavalt sellele, millist valgu omadust eraldamiseks kasutatakse (tabel 4)[50].

Tabel 4. Erinevate vedelik-kromatograafiliste meetodite põhimõte

Molekuli omadus	Tehnoloogia
Suurus ja kuju	Geelfiltratsioon (GF)
Laeng ja laetud gruppide asetus	Ionvahetuskromatograafia (IEX)
Hüdrofoobsus	Hüdrofoobsete interaktsioonide kromatograafia (HIC), pöördfaaskromatograafia (RP)

Biospetsiifilisus (ligandspetsiifilisus)	Afiinsuskromatograafia (AF)
--	-----------------------------

Ioonvahetuskromatograafia põhineb molekulide eraldamisel vastavalt nende laengule. Laetud aminohapped valgu pinnal seostuvad vastaslaengut omava ioonvahetaja laetud molekuli ehk ligandiga. See tehnika võimaldab eraldada molekule, millel on minimaalsed erinevused laengu omadustes. Ioonvahetuskromatograafiat kasutatakse kompleksete proovide lahutamiseks, proovide kontsentreerimiseks ja laetud lisandite eraldamiseks proovist ning see sobib eriti juhtudel, kus proovi karakteristikud pole täpselt teada [51].

Afiinsuskromatograafiat kasutatakse biomolekulide puhastamiseks vastavalt nende bioloogilisele funktsioonile või individuaalsele keemilisele struktuurile ning see sobib keerukamate biokeemiliste segude eraldamiseks. Afiinsuskromatograafia põhineb väga spetsiifilistel biokeemilistel interaktsioonidel, nt antigeeni ja antikeha, ensüümi ja substraadi või retseptori ja ligandi vastastikmõjul ning seda kasutatakse molekulide üheetapiliseks puhastamiseks, rekombinantsete valkude puhastamiseks ja spetsiifiliste lisandite eraldamiseks [52].

Geelfiltratsioon on meetod ainete eraldamiseks molekulmassi alusel, kus molekulid elueeritakse kolonnist molekulmassi kahanevas järjekorras [50].

Hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafia ja pöördfaaskromatograafia on meetodid, mis eraldavad biomolekule vastavalt nende hüdrofoobsusele. Kasutatakse proovide kontsentreerimiseks, hüdrofoobsete lisandite eemaldamiseks ja kompleksete proovide lahutamiseks [53].

1.3 Jogurtikultuuri YC-X11 iseloomustamine

Jogurtikultuur YC-X11 sisaldab piimatoodete valmistamiseks sageli kasutatavaid *Streptococcus thermophilus* ja *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* bakterite perekondi [54]. *S.thermophilus* ja *L.bulgaricus* perekondadest on eraldatud erinevaid ensüüme, näiteks β -GAL-i [18].

S.thermophilus ja *L.bulgaricus* bakteritel on oluline roll soolestiku mikrofloora ökosüsteemis ning piimhappebakterid võivad pärssida patogeensete bakterite kasvu [55]. Lisaks soodustavad jogurtis leiduvad elusad bakterid soolestikus seede- ja imendumisprotsesse, toodavad mitmeid vitamiine ja bioaktiivseid peptiide ning antioksüdante [56].

S.thermophilus ja *L.bulgaricus* bakterite lõhustamiseks on kasutatud nii mehhaanilisi kui ka mittemehhaanilisi meetodeid. Erinevad allikad pakuvad parimaks lõhustamise meetodiks

erinevaid variante. Kuna kasutatud tingimused on väga erinevad, on parima meetodi leidmiseks vajalik optimeerida meetodid vastavalt konkreetsele vajadusele. Lisaks mõjutavad tulemusi lahuse pH, temperatuur, kultuuri vanus, raku kuju, rakukesta kuju jne. Palju sõltub ka sellest, kas konkreetset bakterid asuvad koos või eraldi kultuurides [18]. Jogurtikultuuris YC-X11-s on need bakterid koos, ehkki pole täpselt teada, millises vahekorras.

S.thermophilus ja *L.bulgaricus* kultuure kasvatatakse erinevatel söötmetel, neid on kasvatatud piimas ja mitmetel tehislikel söötmetel nagu Man, Rogosa ja Sharpe vedelsööde (MRS) ja Medium 17 sööde (M17) [18]. Jogurtikultuuri YC-X11 olen varasemas töös kasvatanud lisaks MRS vedelsöötmele ja piimale ka Luria-Bertani (LB) vedelsöötmes [57].

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud reaktiivid

1. Kaaliumdivesinikfosfaat (KH_2PO_4), AppliChem, Lot nr. 8L000272, min. 99,5%
2. Kaaliumhüdrosiid (KOH), AppliChem, Lot nr. 0W006913, min. 85%
3. Ammoniumsulfaat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), AppliChem, Lot nr. 1E006739, min. 99,5%
4. Na-L-laktaat, ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$), Fluka, Sigma Aldrich, Lot&Filling Code 1327993 42307139, 99,0%
5. D(+)-laktoos monohüdraat ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\cdot\text{H}_2\text{O}$), AppliChem, Lot nr.9L004692
6. Kaaliumkloriid (KCl), Reachim, Venemaa, x.ч.
7. β -galaktosidaas (EC 3.2.1.23), *Aspergillus oryzae*, Lot nr. 066K1122, Sigma, 8,4 IU/mg
8. Glükoosi oksüdaas (EC 1.1.3.4), *Aspergillus niger*, Lot nr. 034K1462, Sigma, 17 300 IU/g
9. Galaktoosi oksüdaas (EC 1.1.3.9), *Dactylium dendroides*, Lot nr. 028K8609, Sigma, 76.0 IU/mg
10. Laktaadi oksüdaas (EC 1.13.12.4), *Pediococcus species*, Lot nr. S45938-038, Sigma, 50 IU/mg

2.2 Jogurtikultuuri YC-X11 kasvatamine ja baktermassi ettevalmistamine ensüümide puhastamiseks

Jogurtikultuuri YC-X11 kasvatati 2%-lises Luria-Bertani (LB) vedelsöötmes ($\text{pH} = 7,0$), mis sisaldas 1% trüptooni, 0,5% pärmiekstrakti ja 1% NaCl. 1g YC-X11 juuretise kasvatamiseks kasutati 20 ml LB söödet ja inkubeeriti 25°C juures 24h. Lüofiliseeritud jogurtikultuuri säilitati - 18°C juures.

Saadud bakterimassi homogeniseerimiseks kasutati kahte erinevat meetodit: rakukestade lõhustamine ultraheliga ja mehhaaniline purustamine uhmris. Ultraheliga (UH) purustamisel kasutati erinevaid UH tsükli pikkusi (7/10, 10/10), töötlemise koguaega (5 min, 7 min) ja võimsust (60%, 75%, 90% maksimaalsest võimsusest $70\pm 5\text{ W}$). Uhmris purustamisel proov esmalt külmutati ja seejärel hõõruti aktiivselt 5 minuti jooksul uhmrinuiaga.

Peale bakterimassi membraanide purustamist eraldati sade tsentrifuugimise teel 15 000×g juures, tsentrifuugimise aeg oli 15 minutit ja temperatuur 4 °C.

Saadud lahusest sadestati valgud ammooniumsulfaadiga. Selleks lisati lahusele (NH₄)₂SO₄ arvestusega, et soola lõppkontsentratsioon erinevates katsetes jääks vahemikku 70-80% küllastuskontsentratsioonist, seejärel segati proovi 30 minutit magnetsegajal temperatuuril 11°C. Sade eraldati tsentrifuugimise teel (15 min, 4 °C, 15 000×g).

Saadud sade solubiliseeriti 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvril (0,1 M, pH=6,50) ja dialüüsi samas puhvril 11°C juures 24 tundi. Peale dialüüsi filtreeriti lahus läbi klaasfiltri (põõri suurusega 40 µm), et vähendada segavate ühendite sattumist kolonni.

2.3 Ensüümide aktiivsuse iseloomustamine

Ensüümide eriaktiivsuse määramiseks puhastusprotsessi erinevates etappides viidi mõõtmised läbi Clarki hapniku anduriga õhukindlas termostateeritud 28 ml-ses rakus, millega jälgiti hapniku kontsentratsiooni muutust ensüümi poolt katalüüsitava reaktsiooni käigus. Mõõterakus olevat lahust segati pidevalt ühtlasel kiirusel magnetsegajaga temperatuuril 37 °C ning hapnikuanduri signaal registreeriti 1 sekundilise intervalliga.

Lahuste valmistamiseks kasutati Milli Q vett ning lahuste pH kontrolliti pH-meetri abil täpsusega ±0,02 ühikut. Lahused säilitati 4 °C juures. Mõõtelahused küllastati enne kasutamist õhuhapnikuga tunni jooksul 37°C juures.

LOD aktiivsuse määramiseks kasutati 3mM Na-laktaadi lahust kaaliumfosfaatpuhvril (0,1 M pH=6,50). LOD standardlahus valmistati kaaliumfosfaatpuhvril (0,1 M, pH=6,50).

GAO aktiivsuse määramiseks kasutati 0,14 M laktoosi lahust kaaliumfosfaatpuhvril (0,1 M pH=6,50). GAO standardlahus valmistati kaaliumfosfaatpuhvril (0,1M, pH=6,50).

β-GAL aktiivsuse määramiseks kasutati samuti 0,14 M laktoosi lahust kaaliumfosfaatpuhvril (0,1 M, pH=6,50); hüdrolyüsi aeg oli 37 °C juures 15 minutit. Seejärel lisati lahusele GOD (100 µl), arvestusega, et GOD lõppkontsentratsioon mõõtelahuses oleks $5,4 \times 10^{-3}$ IU/ml. GOD standardlahus valmistati kaaliumfosfaatpuhvril (0,1M, pH=6,50). β-GALi standardlahuse valmistamiseks lahustati ensüüm kaaliumfosfaatpuhvril (0,1 M, pH=6,50).

Valmistatud ensüümide lahuseid säilitati 1,5 ml viaalides -18°C juures. Mõõtmiste alguses sulatati ensüümlahused 4 °C juures ning kasutati ära 3-4 tunni jooksul.

Hapnikuanduri väljundsignaalist reaktsiooni iseloomustava signaali maksimaalse muutuse parameetri A arvutamiseks kasutati varem väljatöötatud biosensorite mudelit [58,59]:

$$\frac{c_{O_2}(t)}{c_{O_2}(0)} = A \exp(-Bt) + (1-A) - 2A \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\tau_s}{n^2/B - \tau_s} \left[\exp(-Bt) - \exp\left(-n^2 \frac{t}{\tau_s}\right) \right] \quad (3)$$

kus $c_{O_2}(t)$ on lahustunud hapniku kontsentratsioon ajahetkel t ja $c_{O_2}(0)$ hapniku kontsentratsioon reaktsiooni algahetkel $t=0$; τ_s on mõõtesüsteemi inertsiaalse iseloomustav aeg.

Parameeter A on nimetatud mudelis defineeritud järgmisel kujul:

$$A = \frac{k_{kat}^* [E]_{ild} c_S^{lahus}}{k_{diff}^{O_2} K_{O_2} K_S + (k_{kat}^* [E]_{ils} + k_{diff}^{O_2} K_{O_2}) c_S^{lahus}} \quad (4)$$

kus $[E]_{ild}$ on ensüümi kontsentratsioon lahuses, K_S ensüüm-substraat kompleksi dissotsiatsiooni koefitsient, $k_{diff}^{O_2}$ hapniku näitav difusioonikoefitsient, c_S^{lahus} substraadi kontsentratsioon lahuses, k_{kat}^* katalüütiline konstant ja K_{O_2} ensüüm-hapnik kompleksi dissotsiatsioonikonstant. Parameetri A väärtust, mis iseloomustab signaali maksimaalsed võimalikku kogumuutust, kasutati ensüümide aktiivsuste iseloomustamiseks. Arvutuste läbiviimiseks kasutati programme SigmaPlot 9.0 ja GraphPad Prism 5.

2.4 Ioonvahetuskromatograafia läbiviimine

Ensüümide eraldamiseks ja puhastamiseks kasutati ÄKTA Purifier 10 vedelikchromatograafia süsteemi, mis võimaldab varieerida voolukiirust vahemikus 0,001-10 ml/min ja rõhku 0-25 MPa. Valkude detekteerimiseks kasutati UPC detektorit, milles on kombineeritud pH, UV adsorptsiooni ($\lambda = 280$ nm) kui ka juhtivuse mõõtmine lahuses.

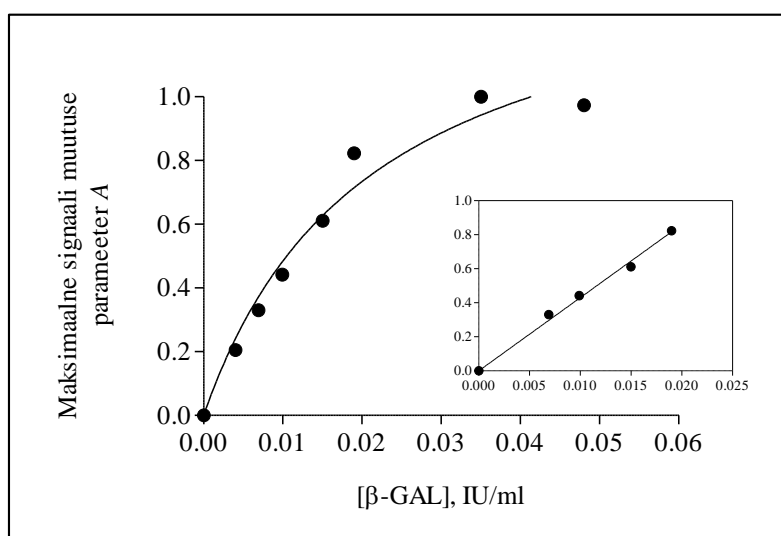
Ioonvahetuskromatograafia läbiviimiseks kasutati dietüülaminoetüül (DEAE FF 16/10) sefaroos anioonvahetuskolonne (20 ml) mida voolutati kolonne esmalt kolmekordse kolonne ruumala 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvriga (pH=6,50) voolukiirusel 0,5 ml/min. Seejärel sisestati proov voolukiirusel 0,3 ml/min ning mitteseostunud osakeste eraldamiseks pesti kolonne kahekordse kolonne ruumala 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvriga (pH=6,50) voolukiirusel 0,5 ml/min. Seostunud valgu eraldamiseks tekitati gradient, milleks kasutati 0,1 M või 1M KCl. Gradient tekitati viieteistkümne kolonne ruumala ulatuses, voolukiirusega 0,5 ml/min. Kolonnist tulevad fraktsioonid koguti 4 ml kaupa ning valku sisaldavates fraktsioonides (detekteeriti UV neeldumise alusel) määrati ensüümide aktiivsused Clarki anduri abil.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Ensüümide aktiivsuste määramine

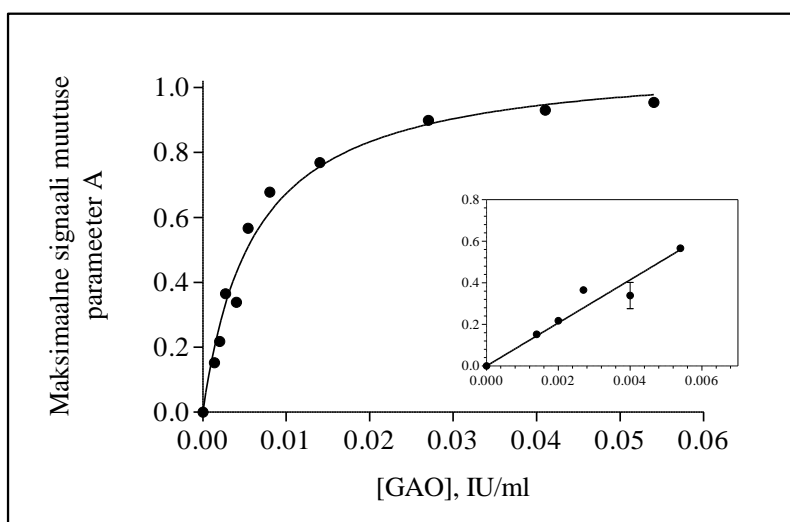
Ensüümide aktiivsuste määramiseks koostati kalibreerimisgraafikud, mille lineaarset osa kasutati ensüümide aktiivsuse määramiseks.

β -GAL aktiivsuse määramiseks koostatud kalibreerimisgraafiku lineaarne osa oli vahemikus 0...0,02 IU/ml (joonis 3); graafiku lineaarse osa tõus oli $43,00 \pm 0,94$ ml/IU.



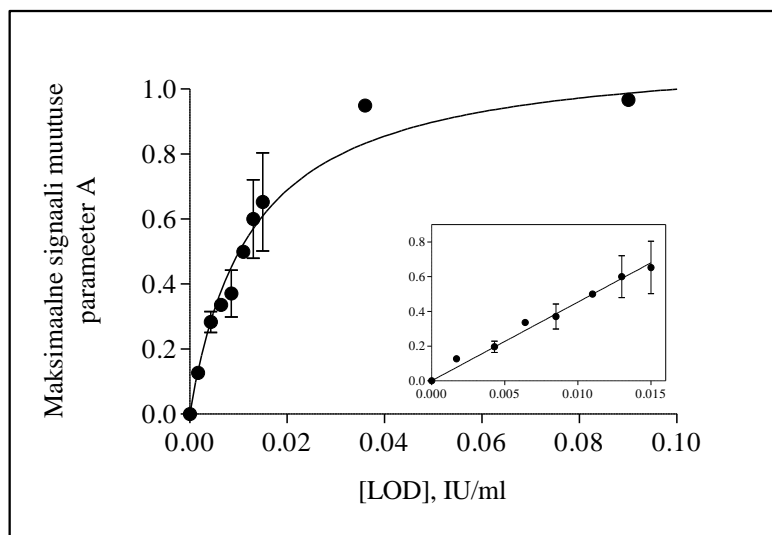
Joonis 3. Maksimaalse väljundsignaali muutuse parameetri sõltuvus β -galaktosidaasi (β -GAL) kontsentratsioonist. Mõõtmised viidi läbi 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvril (pH=6,50), temperatuuril 37 °C ja 0,14 mM laktoosi juuresolekul. Laktoosi hüdrolyüsi aeg oli 15 min, mille järel lisati glükoosi oksüdaasi (ensüümi lõppkontsentratsioon $5,4 \times 10^{-3}$ IU/ml).

GAO aktiivsuse määramiseks koostati kalibreerimisgraafik (joonis 4), mille lineaarne osa oli vahemikus 0 kuni $6,0 \times 10^{-3}$ IU/ml ning graafiku lineaarse osa tõus oli $103,6 \pm 6,7$ ml/IU.



Joonis 4. Maksimaalse väljundsignaali muutuse parameetri sõltuvus galaktoosi oksüdaasi (GAO) kontsentratsioonist. Mõõtmised viidi läbi 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvrts (pH=6,50), temperatuuril 37 °C ja 0,14 mM laktoosi juuresolekul.

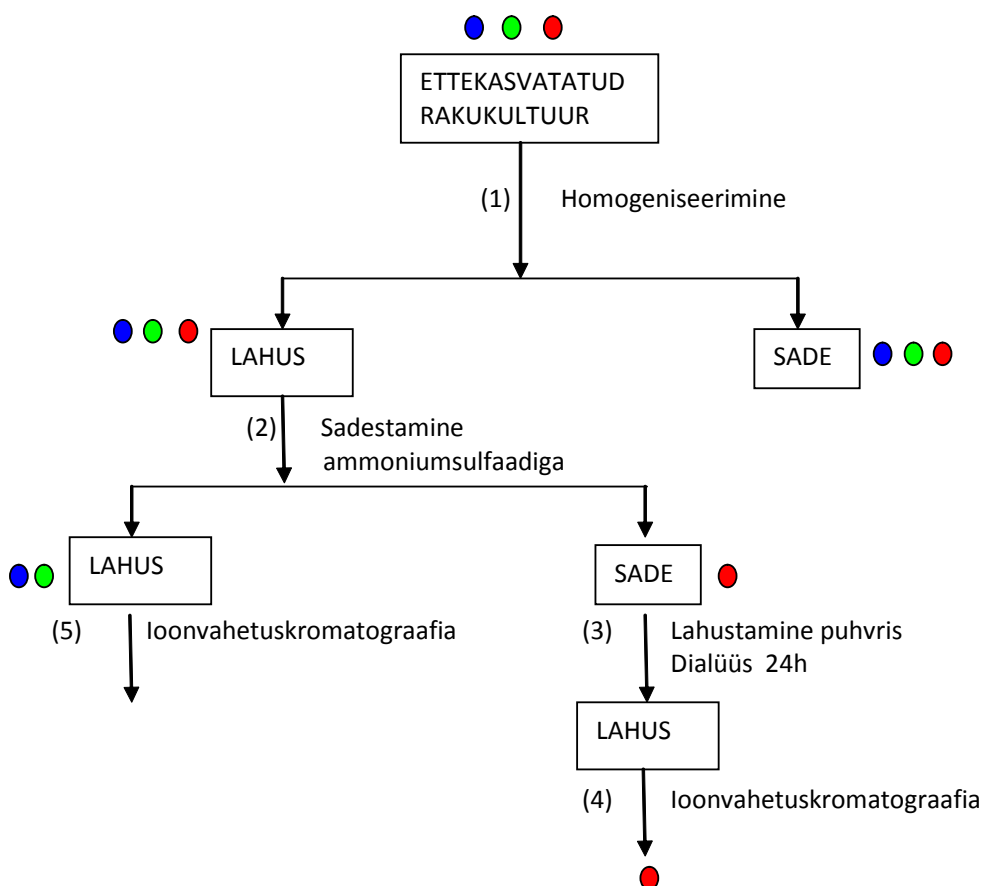
LOD aktiivsuse määramiseks koostati kalibreerimisgraafik (joonis 5), mille lineaarne osa oli 0 kuni $1,5 \times 10^{-2}$ IU/ml; graafiku lineaarse osa tõus oli $45,36 \pm 1,99$ ml/IU.



Joonis 5. Maksimaalse väljundsignaali muutuse parameetri sõltuvus laktaadi oksüdaasi (LOD) kontsentratsioonist. Mõõtmised viidi läbi 0,1 M kaaliumfosfaatpuhvrts (pH=6,50) 3 mM naatriumlaktaadi juuresolekul temperatuuril 37 °C.

3.2 Antibiootikumide biosensoris kasutatavate ensüümide YC-X11 jogurtikultuurist eraldamise strateegia optimeerimine

Ensüümide puhastamise skeem jogurtikultuurist YC-X11 on toodud joonisel 6, kus erinevate ensüümide sisaldumine erinevates ekstraktides on näidatud värviliste tingmärkidega.



Joonis 6. β -galaktosidaasi, galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi eraldamise skeem jogurtikultuurist YC-X11. Puhastusetapid on tähistatud numbritega.

- β -galaktosidaas
- Laktaadi oksüdaas
- Galaktoosi oksüdaas

Esimeseks etapiks (1) oli ettekasvatatud kultuuri homogeniseerimine ja rakukestade purustamine, mille tulemusena jäi lahusesse algsest ensüümide koguhulgast 79-85%. Selles etapis saadud rakumembraane ja muid segavaid ühendeid näiteks organelle, makromolekule ja

kofaktoreid sisaldav sade jäeti kõrvale ning seda ei kasutatud enam edaspidistes katsetes, sademesse jäi ensüüme 15-21% koguhulgast.

Puhastamise protsessi teises etapis (2) sadestati valgud ammoniumsufaadiga, mille kontsentratsioon oli 75% küllastuskontsentratsioonist; selle tulemusena jäi suurem osa LOD-d ja GAO-d lahusesse, β -GAL aga sadenes välja. Järgnevad puhastamise ja eraldamise etapid kulgesid sademe ja lahuse jaoks erinevalt, kuna eraldatavad ensüümid jäid eri fraktsioonidesse.

Sade, mis saadi peale ammoniumsulfaadiga sadestamist (3) ning milles sisaldus β -GAL lahustati kaaliumfosfaatpuhvril (0,1 M, pH = 6,50), seejärel dialüüsi 24 h samas puhvril 11°C juures magnetsegajal. Saadud dialüüsitud proov sisestati DEAE sefarooskolonni (4), mis võimaldab lahutada negatiivselt laetud molekule.

Lahus, mis saadi peale ammoniumsulfadiga sadestamise etappi (5) sisestati ilma vahe etappideta otse DEAE kolonni.

3.3 Jogurtikultuuri YC-X11 homogeniseerimine

Rakukultuuri homogeniseerimiseks kasutati erinevaid meetodeid, mille tulemused on toodud tabelis 5.

Tabel 5. Juuretise YC-X11 homogeniseerimine erinevatel tingimustel. Ensüümide β -galaktosidaasi, galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi eriaktiivsused protsentides erinevates fraktsioonides.

HOMOGENISEERIMISE MEETOD	LOD		GAO		β -GAL	
	SADE %	LAHUS %	SADE %	LAHUS %	SADE %	LAHUS %
UH 5 min, tsükel 7/10, võimsus 60%	37±2	63±2	20±3	80±3	33±2	67±2
UH 5 min, tsükel 10/10, võimsus 60%	17±4	83±4	30±3	70±3	25±3	75±3
UH 7 min, tsükel 10/10, võimsus 60%	50±5	50±5	33±2	67±2	30±3	70±3
UH 5 min, tsükel 7/10, võimsus 75%	25±5	75±5	27±2	73±2	33±3	67±3

UH 5 min, tsükkel 7/10, võimsus 90%	15±2	85±2	19±3	81±3	21±4	79±4
Mehhaaniline purustamine uhmris	17±3	83±3	35±6	65±6	42±2	58±2

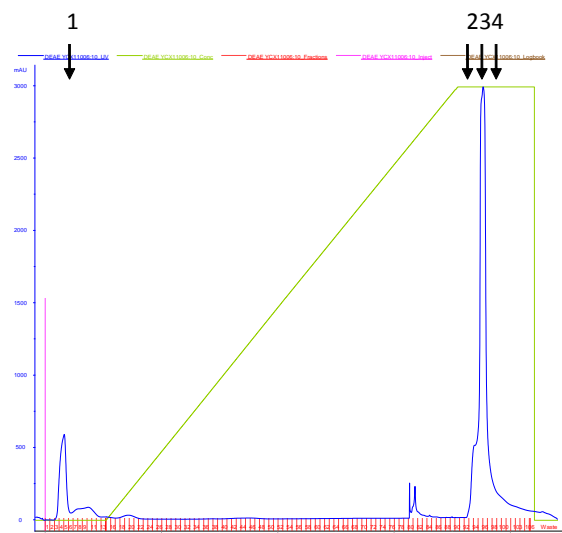
Peale rakukultuuri homogeniseerimist oli ensüümide sisaldus suurem lahuses. Rakukultuuride efektiivseimaks lõhustamise meetodiks osutus UH-ga lõhustamine 5 minuti jooksul, tsüklite intensiivsuseks oli 7/10 ja võimsuseks 90%. Kirjeldatud meetod oli efektiivseim kõigi kolme ensüümi jaoks, kuna kõikide ensüümide suhtelised aktiivsused lahuses olid sademega võrreldes kõrged (79-85% koguaktiivsusest lahuses). Kõrgeid aktiivsusi üksikute ensüümide suhtes saadi ka teisi homogeniseerimise meetodeid kasutades, kuid kuna ülejäänud ensüümide aktiivsus oli samal ajal madal, siis edaspidises töös neid homogeniseerimise tingimusi ei kasutatud. Näiteks rakkude mehhaanilisel purustamisel uhmris oli LOD aktiivsus küll 83%, kuid samas GAO-l oli see 65% ja β -GAL-il vaid 58%.

Alglahuses, millest alustati ensüümide puhastamist, oli β -GAL-i koguaktiivsus 284,6 IU-d, GAO-l 2,6 IU-d ja LOD-l 3,0 IU-d.

3.4 Ensüümide eraldamine ioonvahetuskromatograafia abil

3.4.1 β -galaktosidaasi eraldamine

Peale kolmeetapilist ettevalmistamise protsessi sisestati β -GALi sisaldav lahus ioonvahetuskromatograafia kolonni; valgusisaldust eluaadis määrati neeldumise järgi lainepikkusel 280 nm. Saadud kromatogramm on toodud joonisel 7.

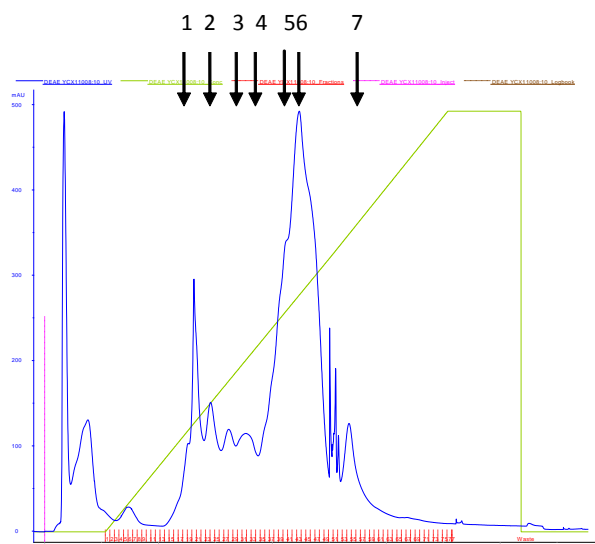


Joonis 7. Ioonvahetuskromatograafia DEAE Sefaroos kolonniga β -galaktosidaasi eraldamiseks. Puhver A oli kaaliumfosfaatpuhver (0,1M pH=6,50); puhver B KCl 0,1M lahus kaaliumfosfaatpuhvril (0,1M, pH=6,50). Voolukiirus 0,5 ml/min, temperatuur 11°C. Sinine joon tähistab neeldumist eluendis lainepikkusel 280 nm; roheline joon tähistab ioonse jõu suurenemist soola lahuses. Numbrid noolte juures tähistavad analüüsitud proove.

Ioonvahetuskromatograafia läbiviimisel gradiendiga kuni 0,1 M KCl kolonnile seondunud β -GAL ei eraldunud ning alles ioonse jõu tõstmisel elueerus β -GAL koos teiste proovis leiduvate valkudega.

Esimesele piigile vastavates fraktsioonides, mis eraldusid enne gradiendi rakendamist ja kus olid mitteseondunud osakesed, analüüsil otsitavat β -GAL ei leidunud. β -GAL-i leidis fraktsioonides, mis on tähistatud nr. 2, 3 ja 4, kusjuures piigis, mis vastas fraktsioonile nr 3, leidis seda kõige rohkem. Määrares ensüümi aktiivsuse kõikides fraktsioonides, kus seda leidis, saadi ensüümi β -GAL koguhulgaks kokku 79,71 IU (3,99 IU/ml). Kõige kõrgemat β -GALi aktiivsust näidanud fraktsioonis nr. 3 oli β -GAL-i eraktiivsus 9,8 IU/ml. See on kirjandusest saadud andmetega võrreldes hea tulemus, sest *Lactobacilluste* perekonnast eraldatud ensüümile on saadud eraktiivsuseks 1,57 IU/ml. Samas teistest kultuuridest eraldatud β -GALi eraktiivsuseks on saadud 124 IU/ml.

Seejärel suurendati eluendi kontsentratsiooni kuni 1 M KCl, kusjuures kõik proovi ettevalmistavad etapid olid samad. Saadud kromatogramm on toodud joonisel 8.



Joonis 8. Ioonvahetuskromatograafia DEAE Sefaroos kolonniga β -galaktosidaasi eraldamiseks. Puhver A oli 0,1M kaaliumfosfaatpuhver (pH=6,50); puhver B KCl 1M lahus kaaliumfosfaatpuhvrts (0,1M, pH=6,50). Voolukiirus 0,5 ml/min, temperatuur 11°C. Sinine joon tähistab neeldumist eluendis lainepikkusel 280 nm; roheline joon tähistab ioonse jõu suurenemist soola lahuses. Numbrid noolte juures tähistavad analüüsitud proove.

Numbritega tähistatud piike ja nendele vastavaid fraktsioone analüüsiti β -galaktosidaase aktiivsuse olemasolu suhtes. Piikidele numbritega 1, 5, 6 ja 7 vastavates fraktsioonides β -GALi ei leitud. Piikidele, mis vastavad tähistatud fraktsioonidele nr. 2, 3 ja 4 leidis otsitavat ensüümi. Ensüümi koguaktiivsuseks nendes kolmes fraktsioonis kokku saadi 91,1 IU-d (10,4 IU/ml). Suurim oli β -GAL aktiivsus piigile nr. 3 vastavas fraktsioonis, kus β -GAL-i eriaktiivsuseks saadi 16,7 IU/ml. Ensüümi β -GAL koguaktiivsused erinevates puhastusetappides on toodud tabelis 6.

Tabel 6. Ensüümi β -GAL aktiivsused erinevates puhastamise etappides.

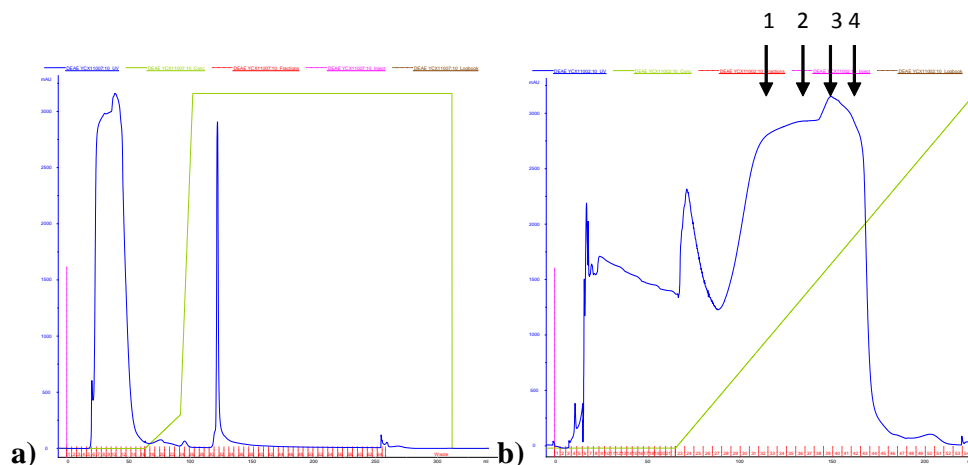
	β-GAL	
	Koguaktiivsus IU	Suhteline aktiivsus %
Bakterikultuur	284,6	100

LAHUS peale homogeniseerimist	237,0	83
SADE peale sadestust (NH ₄) ₂ SO ₄ –ga (75% soola küllastuskontsentratsioonist)	226,7	80
Puhvris lahustatud SADE peale dialüüsi	226,7	80
Ioonvahetuskromatograafia	91,1	32

Kogu puhastusprotsessi käigus saadi kätte 32% ensüümi, mis on võrreldes varasemalt kätte saadud tulemustega väga hea. Samast kultuurist varasemalt eraldatud ensüümi koguseks on kirjanduses saadud 0,3% eriaktiivsusega 1,57 IU/ml [21], samas kui antud töös oli eriaktiivsuseks 16,7 IU/ml. Teistest kultuuridest eraldatud β -GAL-i puhastamisel oli saagise protsent 8 algsest kogusest [20].

3.4.2 Galaktoosi oksüdaasi ja laktaadi oksüdaasi eraldamine

Ensüüme LOD-d ja GAO-d sisaldav lahus sisestati DEAE kolonni; saadud kromatogrammid on toodud joonisel 9.



Joonis 9. LOD ja GAO eraldamisene DEAE sefaroos kolonniga: a) elueerimine kohe pärast seondumist b) proovi inkubeeritud kolonnis 15 tundi. Puhver A oli 0,1 M kaaliumfosfaatpuhver (pH=6,50); puhver B KCl 0,1 M lahus 0,1 M kaaliumfosfaatpuhverlahuses (pH=6,50). Voolukiirus 0,5 ml/min, temperatuur 11°C. Sinine joon tähistab neeldumist eluendis lainepikkusel 280 nm; roheline joon tähistab ioonse jõu suurenemist soola lahuses. Numbrid noolte juures tähistavad analüüsitud proove.

Joonisel 9a on näha, et lahuses olevad valgud on seondunud suhteliselt nõrgalt ning eralduvad juba madala ioonse jõu juures. Sellest tulenevalt jäeti proov kolonni seisma (ca 15 tunniks), et vaadata, kas seondumist toimub. Tulemus on näha joonisel 9b. Kuna seondumine toimus, analüüsiti numbritega tähistatud piikidele vastavaid fraktsioone nii galaktoosi oksüdaasi kui ka laktaadi oksüdaasi aktiivsuste suhtes.

Kõrgeimat aktiivsust näitas nii LOD kui GAO korral fraktsioon nr. 2, kus nende ensüümide aktiivsused olid vastavalt 2,2 IU-d ja 1,6 IU-d. LOD ja GAO aktiivsust leiti ka fraktsioonides nr. 1, 3 ja 4. Koguaktiivsus kõikides aktiivsetes fraktsioonides kokku oli LOD-l 2,5 IU-d ja GAO-l 2,0 IU-d. Ensüümide LOD ja GAO aktiivsused puhastusprotsessi erinevates etappides on kokkuvõtlikult toodud tabelis 7.

Tabel 7. Laktaadi oksüdaasi ja galaktoosi oksüdaasi aktiivsused puhastamise erinevatel etappidel.

	LOD		GAO	
	Aktiivsus IU	Aktiivsus %	Aktiivsus IU	Aktiivsus %
Bakterikultuur	3,0	100	2,6	100
LAHUS peale homogeniseerimist	2,5	83	2,2	85
LAHUS peale (NH ₄) ₂ SO ₄ sadestust (75% soola küllastuskontsent.)	2,5	83	2,0	81
Ioonvahetuskromatograafia	2,5	83	2,0	81

Peale bakterikultuuri homogeniseerimist olid LOD ja GAO saagised lahuses vastavalt 83% ja GAO-d 85%; pärast ammoniumsulfaadiga sadestamist LOD aktiivsus praktiliselt ei muutunud, samas kui GAO aktiivsus vähenes sadestamisel 4% ja lahusesse jäi seda ensüümi algsest 81%.

Edaspidi tuleks nende oksüdaaside eraldamiseks proovida kasutada väiksemat voolukiirust või inkubeerimist, et ensüümid seonduksid paremini kolonniga. Parema tulemuse saamiseks võiks enne ioonvahetuskromatograafiat läbi viia dialüüs või kasutada väljasoolamise kolonne, et proovides vähendada kõrget soolakontsentratsiooni.

3.5 Järeldused ja eksperimendi edasine planeerimine

Ensüümi β -GAL-i eraldamiseks kasutati neljaetapilist puhastamise protessi, mille korral saadi ensüüm, mis on kasutatav ka biosensorite selektiivse osana. Kõrgema aktiivsusega ensüümi saamiseks võib proovida rakkude kultiveerimist teistel söödetel.

Ensüümide LOD ja GAO puhastamisel jõuti tulemuseni, kus vastavad ensüümid olid koos teiste valkudega ühises fraktsioonis, mille eriaktiivsus nende ensüümide suhtes oli küllaltki madal. See tähendab, et ensüümide LOD ja GAO eraldamiseks ja kasutamiseks biosensorrivi biosensorites tuleks modifitseerida puhastusprotsessi. Oluline on vabaneda valkude sadestamiseks lisatud sooladest - selleks võib kasutada dialüüsi või väljasoolamise kolonne. Viimane meetod annab eeldatavalt paremaid tulemusi, kuna töös läbiviidud dialüüs tulemusi ei andnud. Lisaks on soovitatav ioonvahetuskromatograafias kasutada väiksemat voolukiirust, et kõik ensüümid seostuksid kolonni.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli eraldada antibiootikumide biosensorivis kasutatavad laktaatide oksüdeerimist ning laktoosi oksüdeerimist ja hüdroolüüsi katalüüsivad ensüümid: β -galaktosidaas (β -GAL), galaktoosi oksüdaas (GAO) ja laktaadi oksüdaas (LOD). Nende eraldamiseks valiti piimatoodete valmistamiseks kasutatav juuretis YC-X11, millel on kirjanduse põhjal olemas aktiivsus piimas leiduva laktoosi ja laktaatide suhtes. Mikroorganisme paljundati ning optimeeriti juuretises olevate rakkude homogeniseerimist ja proovide ettevalmistamist ioonvahetuskromatograafiasse sisestamiseks. Ensüümide eraldamiseks optimeeriti tingimusi ioonvahetuskromatograafia läbiviimiseks ning eraldati ensüüm β -GAL, mida on võimalik edasises töös kasutada biosensorites bioselektiivse osana. Ensüümide LOD ja GAO eraldamiseks tuleb edaspidi modifitseerida proovide ettevalmistamise etappe nii, et oleks võimalik nende ensüümide eraldamine ioonvahetuskromatograafia meetoditega.

SUMMARY

Purification and separation of enzymes for their application in antibiotic biosensor array

Meeli Arujõe

The presence of antibiotics residues is an increasing problem nowadays due to their unjustified wide use, leading to the development of antibiotics resistant bacteria. In 2013, the British government officials compared the threat of uncontrolled use of antibiotics with the threat of world-wide terrorism. So the determination of antibiotic residues in our food and environment is of utmost importance. For the rapid analysis of antibiotics, biosensing systems based on different enzymes are a promising option.

The aim of the present work was to purify three enzymes: β -galactosidase, galactose oxidase and lactate oxidase which oxidize lactate and lactose and catalyze lactose hydrolysis which can be used in a biosensor array for the detection of antibiotics in milk. Yoghurt culture YC-X11, exhibiting activity towards lactose and lactate was chosen as a starting platform for purifying the abovementioned enzymes. The microorganisms were grown in a suitable LB broth; methods for the cell culture homogenization and for the preparation of probes for ion-exchange chromatography were optimized.

As a result, β -galactosidase was purified with 32% efficiency and its specific activity was 16.7 IU/ml, but the other 2 enzymes - galactose oxidase and lactate oxidase were in the same fraction after the ion-exchange chromatography. It will be necessary to modify the preparation stages of the culture extract to purify and separate GAO and LOD in the future.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Kutsar K. Antibiootikumid ja antibiootikum-resistentsus, Terviseamet.
http://www.terviseamet.ee/fileadmin/dok/Nakkushaigused/ab_paev/Antibiootikumid_ja_resistentsus_2.pdf viimati uuendatud 21.05.2013
2. <http://www.postimees.ee/1166156/suurbritannia-resistentsus-antibiootikumidele-on-ulemaailmne-oht> viimati uuendatud 21.05.2013
3. Dewdney J.M, Maes L, Raynaud J.P, Blanc F, Scheid J.P, Jackson T, Lens S, Verschueren C. Risk assessment of antibiotic residues of B-lactams and macrolides in food products with regard to their immunoallergic potential. Food and Chemical Toxicology 1991; 29(7):477-483.
4. Grunwald L, Petz M. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt. Analytica Chimica Acta 2004; 483(1-2):73-79.
5. Mutlu, M. (2011) Biosensors in Food Processing, Safety, and Quality Control, CRC Press.
6. Rinken T, Riik H. Determination of antibiotic residues and their interaction in milk with lactate biosensor. Journal of Biochemical and Biophysical 2006; 66(1-3): 13-21.
7. Luong J.H.T, Male K.B, Glennon J.D. Biosensor technology: Technology push versus market pull. Biotechnology Advances 2008; 26(5):492-500.
8. Goulette R.R. Investigation of Safe-Level testing for Beta-lactam, sulfonamide and tetracycline residues in commingled bovine milk, Pell Scholars and Senior Thesis 2007.
9. Mascini M, Moscone D, Palleschi G, Pilloton R. In-line determination of metabolites and milk components with electrochemical biosensors. Analytica Chimica Acta 1988; 213(1-2): 101-111.
10. Lourenço R.J.M, Serralheiro M.L.M, Rebelo M.J.F. Development of a New Amperometric Biosensor for Lactose Determination 2003 Portugaliae Electrochimica Acta 21(2): 171-177.
11. <http://www.brenda-enzymes.org> viimati uuendatud 21.05.2013
12. Rhimi M, Aghajari N, Jaouadi B, Juy M, Boudebouze S, Maguin E, Haser R, Bejar S. Exploring the acidotolerance of beta-galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: an attractive enzyme for lactose bioconversion. Research in Microbiology 2009;160(10):775-784.

13. Neri D.F.M, Balcão V.M, Costaa R.S, Rochaa I.C.A.P, Ferreira E.M.F.C, Torresa DPM, Rodriguesa LRM, Carvalho LB. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry* 2009; 115(1):92-99.
14. Adams R.M. Characterization of two cold-sensitive mutants of the beta-galactosidase from *Lactobacillus delbruckii* subsp. *Bulgaricus*. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(8):5666-5672.
15. Nagaoka S, Kawai Y, Kitazawa H, Itoh H, Kimura K, Taketomo N, Yamazaki Y, Tatenos Y, Saito T. Honda H, Kataoka F. Beta-galactosidase, phospho-beta-galactosidase and phospho-beta-glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. *Letters in Applied Microbiology* 2007; 45(5):461-466.
16. Smart. J, Richardson.B. Molecular properties and sensitivity to cations of beta-galactosidase from *Streptomyces thermophilus* with four enzyme substrates. *Applied Microbiology Biotechnology* 1987; 26(1): 92-95.
17. Kotia N, Vasileva N. Biosensors for determination of lactose by immobilized betagalactosidase: A Review. 2010; 49 (seria 9.2): 23-30.
18. Tari C, Ustok F.I, Harsa S. Production of Food Grade beta-Galactosidase from Artisanal Yogurt Strains. *Food Biotechnology* 2010; 24(1):78-94.
19. Shin J.H, Lee G.M, Kim J.H. Comparison of cell disruption methods for determining β -galactosidase activity expressed in animal cells. *Biotechnology Techniques* 1994; 8(6):425-430.
20. Gul-Guven R, Guven K, Poli A, Nicolaus B. Enzyme and Microbial Technology Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica. *Enzyme and Microbial Technology* 2007; 40(6):1570–1577.
21. Mozumder N.H.M.R, Akhtaruzzaman M, Bakr M.A, Zohr T.F. Study on Isolation and Partial Purification of Lactase (β -galactosidase) Enzyme from *Lactobacillus* Bacteria Isolated from Yogurt. *Jornal of scientific research* 2012;4 (1): 239-249.
22. Shleev S, Tkac J, Christenson A, Ruzgas T, Yaropolov I.A, Whittaker J.W, Gorton L, Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 2005; 20(12):2517-2554.
23. Gasparotto E.P.L, Abrão S.C.C, Inagaki S.Y, Tessmann D.J, Kemmelmeier C, Tessmann I.P.B. Production and Characterization of Galactose Oxidase Produced by

- Four Isolates of *Fusarium graminearum*. The journal Brazilian Archives of Biology and Technology. 2006; 49 (4):557-564.
24. Whittaker J.W. The radical chemistry of galactose oxidase, Archives of Biochemistry and Biophysics 2005; 433 (1): 227–239.
 25. Whittaker M.M, Whittaker J. The Active Site of Galactose Oxidase. Journal of Biological Chemistry, 1987; 263 (13): 6074-6080.
 26. Mendoca M.H, Zancan G.T. Purification and characterization of intracellular galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1987; 252(2):507-514.
 27. Alberton D, Silva de Oliveira L, Peralta RM, Barbosa-Tessmann IP. Production, purification, and characterization of a novel galactose oxidase from *Fusarium acuminatum*. J Basic Microbiol. 2007; 47(3):203-212.
 28. Rogers M.S, Hurtado-Guerrero R, Firbank S.J, Halcrow M.A, Dooley D.M, Phillips S EV, Knowles PF, McPherson MJ. Cross-Link Formation of the Cysteine 228-Tyrosine 272 Catalytic Cofactor of Galactose Oxidase Does Not Require Dioxygen. Biochemistry 2008; 47(39): 10428–10439.
 29. Mazitsos C.F , Rigden D.J, Tsoungas P.G, Clonis Y.D. Galactosyl-biomimetic dye-ligands for the purification of *Dactylium dendroides* galactose oxidase. Journal of Chromatography A 2002; 954(1–2):137–150.
 30. Cosnier S, Innocent C. Detection of Galactose and Lactose by a Poly(Amphiphilic Pyrrole)-Galactose Oxidase Electrode. Analytical Letters 1994; 27(8): 1429-1442.
 31. Frey P.A, Hegeman A.D. Enzymatic Reaction Mechanisms. (2007) Oxford University Press, Oxford.
 32. Furuichi M, Suzuki N, Dhakshnamoorthy B, Minagawa H, Yamagishi R, Watanabe Y, Y. Goto, Kaneko H, Yoshida Y, Yagi H, Waga I, Kumar PK, Mizuno H. X -ray Structures of *Aerococcus viridans* Lactate Oxidase and Its Complex with d-Lactate at pH 4.5 Show an [alpha]-Hydroxyacid Oxidation Mechanism. Journal of Molecular Biology, 2008; 378(2): 436-446.
 33. Giegel D.A, Massey V, Williams C. L-lactate-2-monooxygenase. Sequence of peptides containing residues modified by 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. Journal of Molecular Biology 1987; 262(12): 5705-5710.
 34. Song Gu J, Xiu Wang Y, Jiao Q. Effect of Catalase on Biocatalytic Synthesis of Pyruvate by Enzymes from *Pseudomonas* sp. Chinese Chemical Letters 2004; 15(11): 1299-1302.

35. Xu P, Yano T, Yamamoto K, Suzuki H, Kumagai H. Characterization of a lactate oxidase from a strain of gram negative bacterium from soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1996; 56(3): 277-288.
36. Choi M.M.F. Application of a long shelf-life biosensor for the analysis of l-lactate in dairy products and serum samples. *Food Chemistry* 2005; 92(3): 575-581.
37. Suman S, Singhal R, Sharma AL, Malthotra B.D, Pundir C.S. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2005; 107(2): 768–772.
38. <http://www.biolab.co.uk/docs/dlactate.pdf> viimati uuendatud 22.05.2013
39. MuhJ U. Williams C.H, Massey V. Lactate monooxygenase. II. Site-directed mutagenesis of the postulated active site base histidine 290. *Journal of Biological Chemistry*. 1994 269(11):7989-7993.
40. Biryukova E. N, Stupar YO, Arinbasarova AY,. Medentsev AG. *Yarrowia lipolytica*, a Producer of L-lactate oxidase. *Microbiology* 2009; 78(5): 650-652.
41. Kupletskaya M. B, Sukacheva M. V, Kurakov A. V, Netrusov A. I. Search for Lactate Oxidase Producer Microorganisms. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2007; 43(2):199-202.
42. Gu J, Xu P, Qu Y. A biocatalyst for pyruvate preparation from dl-lactate: lactate oxidase in a *Pseudomonas* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2002; 18(4-6): 299–305.
43. Takemori S, Nakazawa K, Nakai Y, Masayuki K. A Lactate Oxygenase From *Mycobacterium Phlei* Improved Purification And Some Properties Of The Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1968 ;243(2):313-319.
44. López-Más JA, Sánchez-Ferrer A, García-Carmona F, Streitenberger SA. Use of dye affinity chromatography for the purification of *Aerococcus viridans* lactate oxidase. *Department of Biochemistry and Molecular Biology-A* 2002; 18(3):657-659.
45. Romero MR, Ahumada F, Garay F. Baruzzi Aminfiqc, Amperometric Biosensor For Direct Blood Lactate Detection. *Analytical Chemistry*. 2010; 82(13):5568-5572.
46. Patel N.G, Erlenko`tter A, Cammann K, Chemnitius GC. Fabrication and characterization of disposable type lactate oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2000; 67 (1-2): 134 – 141.
47. GE Healthcare, Handbook, Protein Sample Preparation, 2010.
48. Amersham Pharmacia Biotech AB, Handbook, Protein Purification Handbook, 1999.

49. Lee A.K, Lewis DM, Ashman PJ. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy* 2012; 46: 89-101.
50. Amersham Biosciences AB, *Gel Filtration Principles and Methods, Handbook*, 2002.
51. Pharmacia Biotech, *Handbook, Ion Exchange Chromatography, Principles and Methods*, 2002.
52. GE Healthcare, *Handbook, Affinity Chromatography, Principles and Methods*, 2010.
53. GE Healthcare, *Handbook, Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography, Principles and Methods*, 2010.
54. Sook-Young L, Mi-Jung P. The quality characteristics of frozen soy yogurt prepared with soy protein isolate, industrial proteases and commercial mixed cultures. *Korean Journal of Food and Cookery Science* 2004; 20(6): 658-666.
55. Zainab D, De Nandita H, Yadi S.I, Umar A-D. A Study on Inhibitory Effects of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* as Probiotics on Some Clinical Pathogens. *Researcher* 2010; 2(11): 38-41.
56. <http://www.farmi.ee/infot-piimast/jogurt> viimati uuendatud 21.05.2013
57. Arujõe M. Mõnede mikroorganismide ensümaatilise aktiivsuse piimas leiduvate substraatide suhtes. *Bakalaureuse töö*, Tartu, Tartu Ülikool, 2008.
58. Rinken T. The modelling of amperometric biosensors based on oxidoreductases. *PhD töö*, Tartu, Tartu Ülikool, 2000.
59. Rinken T, Tenno T. Dynamic model of amperometric biosensors. Characterisation of glucose biosensor output. *Biosensors & Bioelectronics* 2001; 16(1-2): 53-59.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Meeli Arujõe

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 02.04.1986)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

ANTIBIOOTKUMIDE BIOSENSORRIVIS KASUTAVATE ENSÜÜMIDE
PUHASTAMINE JA ERAOLDAMINE,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Toonika Rinken ja Kairi Kivirand,

(juhendaja nimi)

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni; üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **24.05.2013**